

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE FÍSICA APLICADA



DESARROLLO DE LA MICROSCOPÍA  
HOLOGRÁFICA  
DIGITAL PARA LA MEDIDA DE FORMAS Y  
POSICIONES DE CÉLULAS

Trabajo de Fin de Máster presentado por:

RUBÉN MARTÍNEZ LORENTE

Dirigido por:

DRA. PILAR ARROYO DE GRANDES

DRA. VIRGINIA PALERO DIAZ

MÁSTER EN FÍSICA Y TECNOLOGÍAS FÍSICAS

Curso 2011-2012

# ÍNDICE GENERAL

	Pág
1. INTRODUCCIÓN.....	3
2. HOLOGRAFÍA DIGITAL.....	4
2.1.Fundamentos de holografía digital.....	5
2.2. Reconstrucción de la imagen del objeto.....	5
2.2.1. Propagación de Fresnel.....	5
2.2.2. Convolución.....	6
2.3. Tipos de configuración.....	7
3. MONTAJES EXPERIMENTALES.....	10
3.1. Configuración fuera de eje.....	11
3.2. Configuración en línea.....	14
3.3. Configuración en línea (nueva versión).....	15
4. RESULTADOS.....	19
5. CONCLUSIONES.....	25
BIBLIOGRAFÍA.....	26

# **CAPITULO 1**

## **INTRODUCCIÓN**

La medida de formas y posiciones de objetos genera un gran interés en muchos campos de investigación como la bioingeniería (medicina regenerativa, biología celular, etc.). Es por ello que las técnicas de holografía digital son importantes en esta temática, dado que son técnicas no intrusivas que permiten obtener información 3D del objeto.

A diferencia del resto de técnicas de microscopia como la convencional o confocal que necesitan más de una captura para obtener una imagen tridimensional (volumen), con la microscopia holográfica digital (DHM) se puede obtener una imagen tridimensional de un objeto con un solo registro y su posterior reconstrucción de forma numérica en diferentes planos.

El objetivo de este trabajo es desarrollar y analizar un nuevo sistema de DHM, con una configuración de holografía en línea (Digital In-line Holographic Microscopy DIHM). Este tipo de configuración tiene las ventajas de poder hacerse con un montaje muy simple y al no utilizar lentes u objetivos de microscopio se evitan aberraciones .

Para realizar este trabajo se han utilizado como haces de luz (referencia e iluminación) haces divergentes. Se han registrado hologramas tanto en objetos reglados (test) como en muestras biológicas (células). Además se han analizado y estudiado 3 tipos de configuraciones en holografía: en línea [1], de Fourier [2] y fuera de eje [3].

El trabajo se encuentra estructurado de la siguiente manera. En el capítulo 2 se explican los fundamentos de la holografía digital así como las configuraciones más importantes. Se describen así mismo los métodos de reconstrucción y propagación del holograma registrado. En el capítulo 3 se describe el método experimental que se ha utilizado; en el capítulo 4 se presentan los resultados obtenidos en las configuraciones descritas en el capítulo 3. Finalmente en el capítulo 5 se presentan las conclusiones.

## CAPÍTULO 2

### HOLOGRAFÍA DIGITAL

#### 2.1. Fundamentos de la holografía digital

La holografía fue inventada en 1948 por Dennis Gabor, pero no se desarrolló plenamente hasta que apareció el láser (1960) y se desarrolló la iluminación fuera de eje que amplió considerablemente las aplicaciones de la técnica.

En holografía digital la luz difundida por el objeto de estudio (haz objeto) interfiere con un haz de referencia. Este patrón es registrado digitalmente en un sensor CCD y su imagen es reconstruida posteriormente mediante diferentes técnicas de propagación y reconstrucción numéricas.

Estos dos haces están asociados a ondas objeto ( $o(x, y)$ ) y de referencia ( $r(x, y)$ ) descritas como:

$$o(x, y) = A_o(x, y) \exp[j\phi_o(x, y)] \quad r(x, y) = A_r(x, y) \exp[j\phi_r(x, y)] \quad (2.1)$$

Por lo que la intensidad del patrón de franjas registrado es:

$$I(x, y) = |r(x, y) + o(x, y)|^2 = A_o^2 + A_r^2 + 2A_r^2 A_o^2 \cos(\phi_r - \phi_o) \quad (2.2)$$

Aunque normalmente en holografía, se suele expresar la intensidad del interferograma como:

$$I(x, y) = |r(x, y)|^2 + |o(x, y)|^2 + r^*(x, y)o(x, y) + r(x, y)o^*(x, y) \quad (2.3)$$

Una vez registrado el patrón de interferencias  $I(x, y)$ , para reconstruir la imagen objeto, hemos de multiplicar por una onda de reconstrucción  $c(x, y)$ . La onda resultante  $s(x, y)$  será:

$$s(x, y) = c(x, y)I(x, y) = c|r|^2 + c|o|^2 + cr^*o + cro^* = s_1 + s_2 + s_3 + s_4 \quad (2.4)$$

donde el término  $s_1 + s_2$  se denomina orden 0 (continuo), el término  $s_3$  es el orden -1 (proporcionará la imagen virtual del objeto) y el término  $s_4$  es el orden +1 (proporcionará la imagen real del objeto).

Si la onda de reconstrucción  $c(x, y)$  coincide con la onda de registro  $r(x, y)$ , la onda resultante  $s(x, y)$  es:

$$s(x, y) = r|r|^2 + r|o|^2 + rr^*o + rro^* = r|r|^2 + r|o|^2 + |r|^2o + r^2o^* \quad (2.5)$$

donde los dos primeros términos son el término continuo (orden 0) y el 3<sup>er</sup> término la imagen virtual del objeto (orden -1).

Por otro lado, si la onda de reconstrucción  $c(x, y)$  es la conjugada de la onda de registro  $r(x, y)$ , en este caso la onda resultante  $s(x, y)$  es:

$$s(x, y) = r^*|r|^2 + r^*|o|^2 + r^*r^*o + r^*ro^* = r^*|r|^2 + r^*|o|^2 + r^{*2}o + |r|^2o^* \quad (2.6)$$

donde el 4<sup>o</sup> término es la imagen real (orden+1).

## 2.2. Reconstrucción de la imagen del objeto

La reconstrucción del objeto se puede llevar a cabo mediante dos métodos diferentes: propagación de Fresnel o convolución. A continuación explicamos brevemente la idea fundamental de estos dos métodos.

### 2.2.1. Propagación de Fresnel

El método de propagación de Fresnel ([3], [4]) se utiliza cuando se da la condición de Fresnel (Eq. 2.7).

$$z' = d \gg (x-x'), (y-y') \quad (2.7)$$

con  $(x, y, 0)$  como las coordenadas del plano del holograma,  $(x', y', z')$  las coordenadas del plano de reconstrucción y  $d'$  la distancia entre plano del holograma y del objeto. La idea fundamental consiste en calcular la imagen del patrón de difracción (de Fresnel)  $\Psi(\xi, \eta)$  mediante la ecuación siguiente:

$$\Psi(\xi, \eta) = A \exp \left[ \frac{i\pi}{\lambda d} (\xi^2 + \eta^2) \right] \iint I(x, y) \exp \left[ \frac{i\pi}{\lambda d} (x^2 + y^2) \right] \cdot \exp \left[ \frac{i2\pi}{\lambda d} (x\xi + y\eta) \right] dx dy \quad (2.8)$$

donde  $(\xi, \eta)$  son las coordenadas en el espacio de Fourier (frecuencia) e  $I(x, y)$  es la intensidad del holograma.

La Eq. 2.8 puede verse como una TF con coordenadas espaciales  $(\frac{\xi}{\lambda d}, \frac{\eta}{\lambda d})$  en vez de  $(\xi, \eta)$ . Es decir, en la reconstrucción el tamaño del pixel variará según la distancia entre el objeto y el sensor  $d$ .

Un caso particular es cuando la fuente de la onda de referencia se coloca en el mismo plano que el objeto. En este caso, el registro del patrón de interferencias se toma en el plano de Fourier del sistema. La imagen reconstruida se obtiene haciendo la transformada de Fourier del holograma, donde tanto la imagen real y virtual aparecen enfocadas en dicho plano. Para reconstruir esta imagen se calcula la transformada de Fourier (FTM) quedando una solución como se ve en la ecuación siguiente:

$$\Psi(m, n) = A \exp \left[ \frac{i\pi}{\lambda d} (m^2 \Delta \xi^2 + n^2 \Delta \eta^2) \right] \times FFT \left\{ I(k, l) \exp \left[ \frac{i\pi}{\lambda d} (k^2 \Delta x + l^2 \Delta y) \right] \right\}_{m, n} \quad (2.9)$$

### 2.2.3. Convolución

El método para propagar mediante convolución es un método que presenta varias ventajas frente a la propagación de Fresnel. En primer lugar no existe ninguna condición restrictiva para propagar y en segundo lugar no existe variación en el tamaño de píxel en la reconstrucción. Usando la siguiente expresión se obtiene la imagen en el plano  $z'$ .

$$u'(x', y', z') = \iint_{-\infty}^{\infty} I(\xi, \eta) g(\xi, \eta, x', y') d\xi d\eta \quad (2.10)$$

siendo  $g(\xi, \eta, x', y') = \frac{1}{i\lambda} \frac{\exp(ik\sqrt{(\xi - x')^2 + (\eta - y')^2 + z'^2})}{\sqrt{(\xi - x')^2 + (\eta - y')^2 + z'^2}}$

Es decir, la Eq. 2.10 queda como la inversa de la TF del producto de la TF de la intensidad del holograma  $I(\xi, \eta)$  por la TF de la función  $g(\xi, \eta, x', y')$  o lo que es lo mismo, la convolución de estas dos funciones (Eq. 2.11).

$$u' = TF^{-1} \{ TF[I(x', y')] \cdot TF[g] \} = I(x', y') \otimes g(x', y') \quad (2.11)$$

## 2.3. Tipos de configuraciones

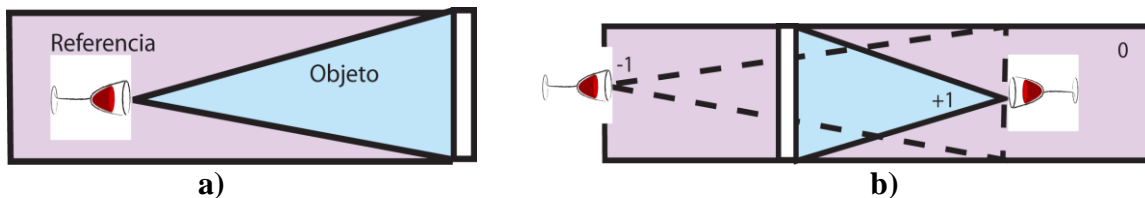
Existen numerosas configuraciones de hologramas, que se clasifican en función de las características que presentan los haces de referencia y objeto (posición, haces divergentes o colimados, etc.) [4]. A continuación describiremos las configuraciones que se van a utilizar en este trabajo.

### 1. Holografía en línea

El haz de referencia y objeto se colocan en línea, llegando ambos haces al sensor de forma paralela (Fig.1a). Esta configuración tiene la ventaja de que el montaje es muy sencillo, fácil de alinear y además se pueden utilizar láseres con longitud de coherencia corta.

Por el contrario, tiene la desventaja de que en la reconstrucción todos los términos (0, +1, -1) salen en la misma dirección. En la Fig.1b se muestra que en el plano en que se enfoca la imagen real, la imagen virtual está desenfocada.

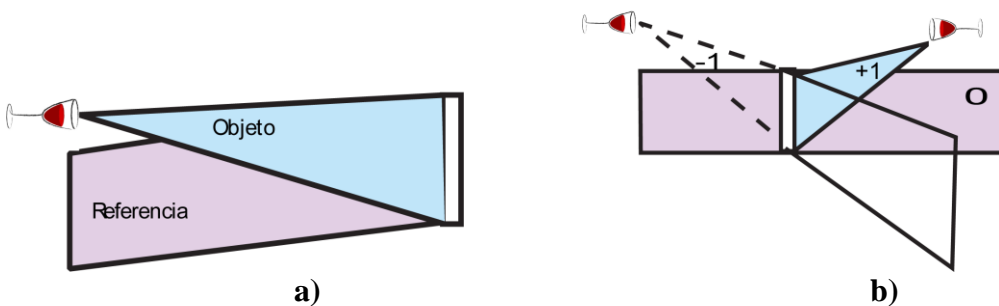
Para poder eliminar el orden cero hay numerosos métodos desarrollados. Dos de los más comunes son la aplicación en la reconstrucción de un filtro pasa-alta cerca de la zona central por un lado y el registro del objeto o la distribución del haz de la referencia sobre el sensor por otro. En este último caso, la imagen del haz de referencia se resta al holograma antes de la reconstrucción mejorando la relación señal/ruido.



**Figura 1: Holografía en línea. a) Registro; b) reconstrucción**

### 2. Holografía fuera de eje

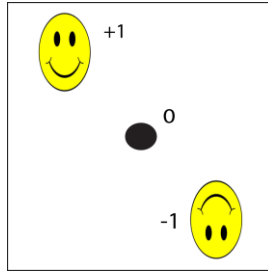
En este caso el haz objeto y el haz de referencia llegan al sensor formando un cierto ángulo entre ellos (Fig.2). Como consecuencia, en la reconstrucción el orden 0, +1 y -1 aparecen completamente separados.



**Fig 2: Holografía fuera de eje. a) Registro; b) reconstrucción.**

### 3. Holografía de Fourier

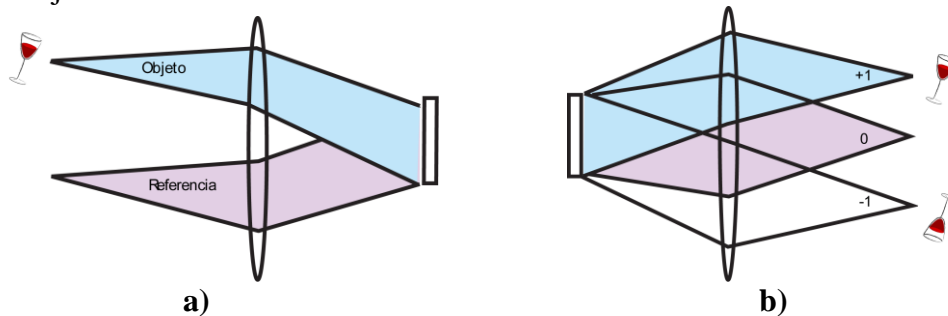
Este es un tipo de holograma especialmente interesante. Se trata de un holograma fuera de eje, en el que como su nombre indica se registra la TF del objeto. En la reconstrucción todos los órdenes aparecen separados y enfocados en el mismo plano (Fig. 3). En el holograma de Fourier hay dos variantes:



**Figura 3: TF de holograma de Fourier.**

- Con lente

El sensor se coloca en el plano focal de una lente (Fig.4). Cuando el objeto se coloca en el plano focal objeto de dicha lente, su TF se forma sobre el sensor. La onda de referencia colimada se obtiene colocando un haz divergente con origen en el mismo plano del objeto.



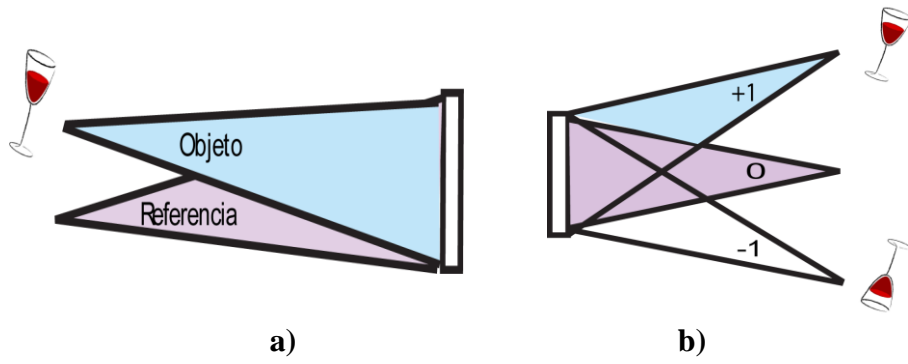
**Figura 4: Holografía de Fourier con lente. a) Registro; b) reconstrucción.**

- Sin lente

Si se elimina la lente y se coloca en su lugar el sensor (Fig. 5), el patrón de interferencias que se obtiene es similar a la configuración de Fourier con lente. La reconstrucción se hace calculando la TF del holograma, obteniendo también las imágenes real y virtual separadas.

Esta última configuración es más habitual en holografía digital, debido sobre todo a la sencillez del montaje.





a) b)  
**Figura 5: Registro de holografía de Fourier sin lente.**

## CAPÍTULO 3

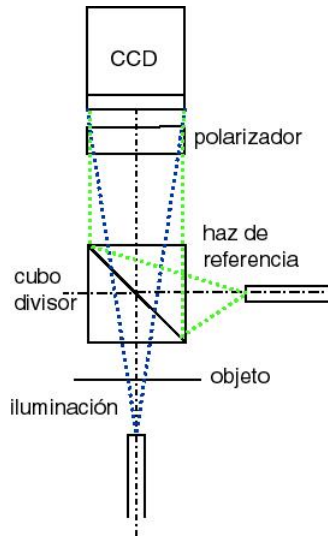
### MONTAJES EXPERIMENTALES

Se ha puesto a punto un sistema típico de microscopia holográfica digital (DHM) fuera de eje como se muestra en la Fig. 6 que, con ligeras variaciones, vamos a emplear en todos los experimentos. Se han analizado dos de las configuraciones explicadas en el capítulo 2 (holografía fuera de eje y en línea) utilizando como haz de referencia un haz divergente.

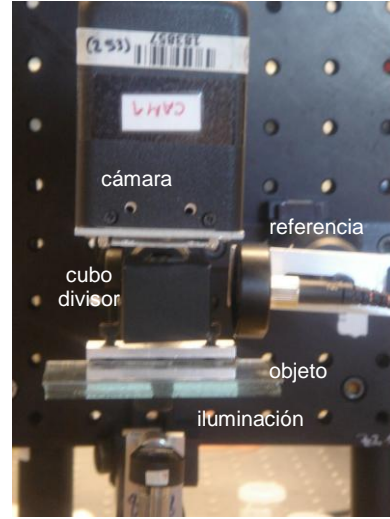
Como iluminación se utilizó un láser de estado sólido ( $\lambda = 532 \text{ nm}$ ) que se dividió en haz objeto y haz de referencia. Ambos haces son guiados por fibra óptica y producen, a la salida de la fibra dos haces divergentes. Dichos haces se recombinan por medio de un divisor de haz (beam splitter 50% -50%) y se hacen interferir en el sensor de una cámara CCD (sensor de 640x480 pixeles de  $7.4 \mu\text{m}/\text{pixel}$ ).

Se utiliza como objeto un trozo de papel milimetrado translúcido que se ilumina por detrás. Según las circunstancias el tamaño de éste puede variar. Se van a registrar hologramas de dicho objeto, así como la imagen del objeto y la distribución del haz de referencia sobre el sensor. Estas dos últimas imágenes se usarán en la reconstrucción del holograma para mejorar la relación señal/ruido.

A continuación se pasa a explicar los diferentes experimentos llevados a cabo con cada configuración.



a)



b)

**Figura 6: a) Esquema del montaje DHM; b) foto del montaje DHM.**

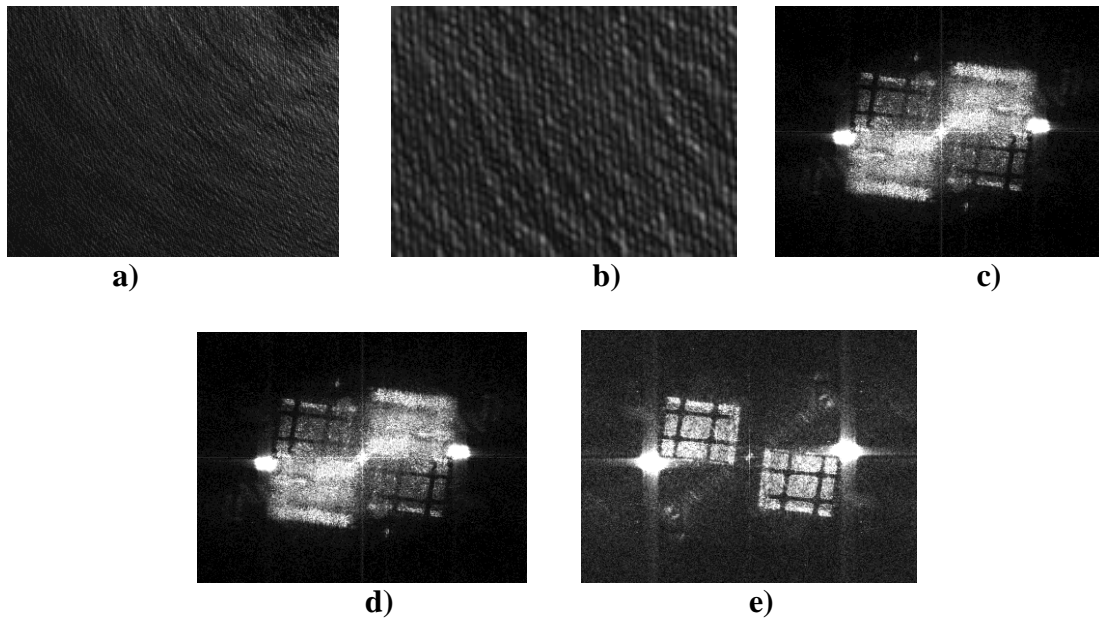
### 3.1. Configuración fuera de eje

En este caso se utiliza el montaje de la Fig. 6 tal y como está. Se ajusta el haz de referencia para tener una configuración de holograma de Fourier sin lente. Es decir, la distancia entre la fuente del haz de referencia hasta la CCD y del objeto hasta la CCD es la misma.

En la Fig. 7a se presenta un ejemplo típico de un holograma registrado en esta configuración. La Fig. 7b muestra una zona aumentada del holograma donde se ve la modulación orientada a  $45^\circ$  respecto a la horizontal. Dicha modulación es la interferencia la luz que pasa sin difractarse con el objeto.

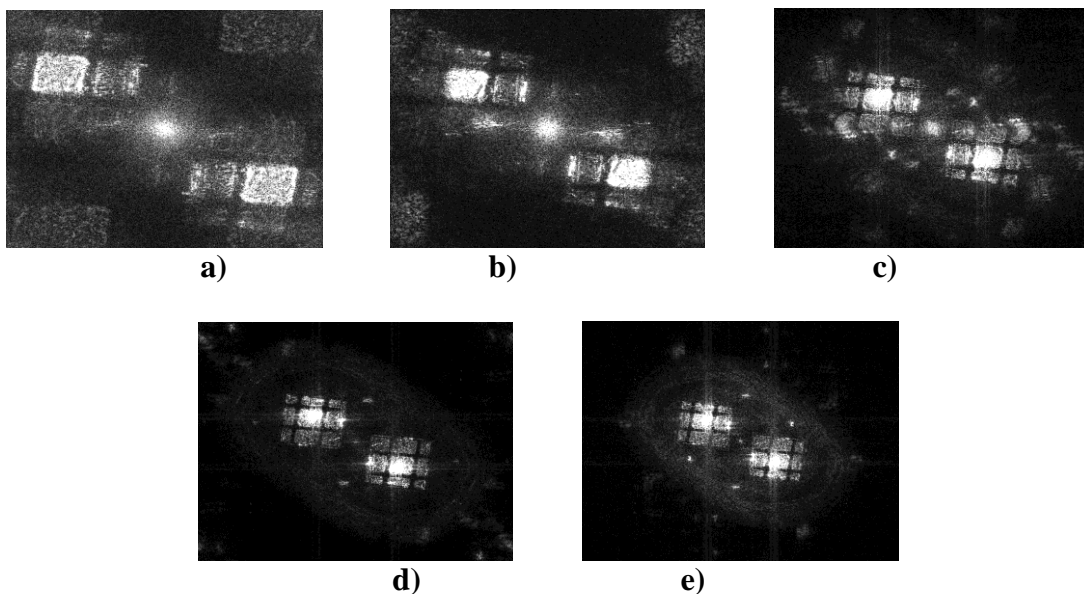
La imagen del objeto se puede reconstruir sin más que calcular la TF del holograma tal cual (Fig. 7c), después de restarle la referencia (Fig. 7d) o después de restarle la referencia y el objeto (Fig. 7e).

La imagen reconstruida que se muestra en la Fig. 7e es la habitual en un holograma fuera de eje: se obtiene la imagen real, la imagen virtual y el orden cero (punto brillante) completamente separadas. En las Figs. 7c y 7d se obtienen además en la diagonal opuesta otras dos imágenes desenfocadas. Estas se deben a la forma de iluminar el objeto, el cual produce otro tipo de holograma como se verá en la sección 3.3.



**Figura 7: a) Holograma; b) modulación del holograma (zoom); reconstrucción de c) holograma; d) holograma restándole la referencia; e) holograma restándole el objeto.**

Un punto importante a estudiar es la dependencia de los aumentos de las imágenes real y virtual en función de la distancia de la CCD al objeto. En la Fig.8 se muestran algunas imágenes obtenidas para diferentes distancias.

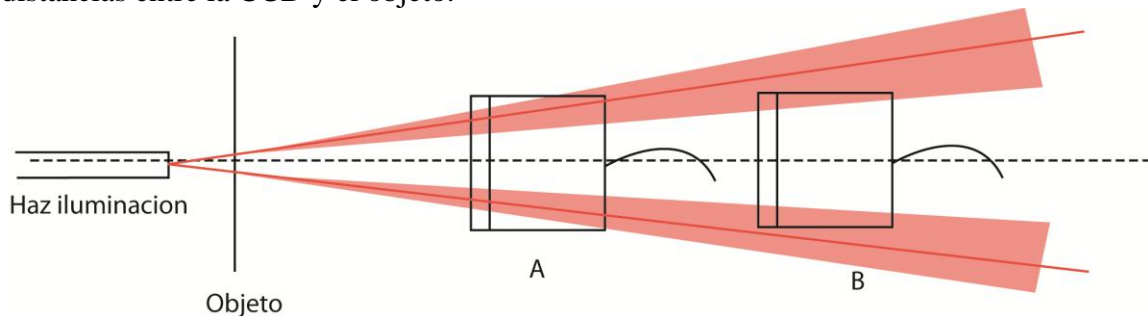


**Figura 8: TF de hologramas restándole la referencia y el objeto para distancias entre objeto y sensor de a) 33 mm ; b) 50 mm ; c) 94 mm; d) 120 mm; e) 150 mm.**

En la Fig.8 se ve que cuanto más cerca está la cámara del objeto, los aumentos de la imagen son mayores. Esto es debido a la relación entre el ángulo que subtiende el sensor y el tamaño de píxel de éste.

La frecuencia máxima que se puede registrar está asociada al tamaño del píxel de la cámara. Por otro lado, la imagen reconstruida tiene un tamaño en frecuencias que depende de la distancia entre el sensor y el objeto. Cuando más cerca esté el sensor del objeto mayor es el ángulo sólido que subtiende cada píxel. Al alejarse la CCD este ángulo disminuye y el objeto se registra en una zona del sensor de menor tamaño. Esto hace que el objeto tenga en el plano de Fourier un tamaño de frecuencias menor que cuando estaba más cerca (Fig. 8a), disminuyendo su tamaño en la TF (Fig.8e).

Además se observa que la imagen reconstruida no tiene una iluminación uniforme. La zona más brillante corresponde a la luz directa que llega del objeto. La luz difundida por el objeto contribuye a formar el resto de la imagen. Esto es consecuencia de que el haz de iluminación del objeto es un haz divergente. En la Fig. 9 ilustramos como se registra en la CCD la luz directa del objeto y la luz que difunde éste para diferentes distancias entre la CCD y el objeto.

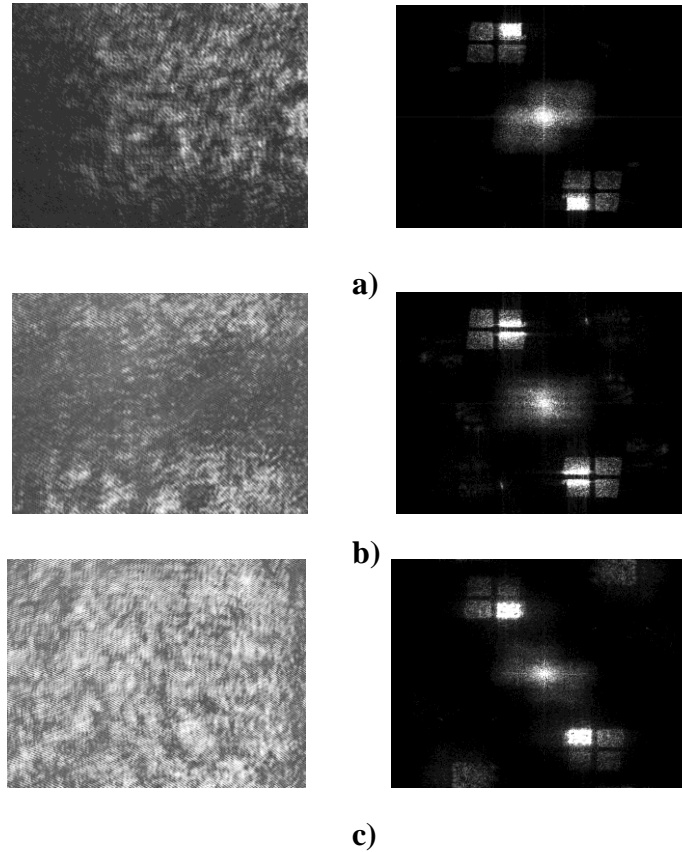


**Figura 9: Esquema del holograma registrado con luz difusa (cono rojo) y luz directa recogida con la CCD cerca del objeto (posición A) y lejos del objeto (posición B).**

En la posición A, cuando la CCD está cerca del objeto se registra tanto la luz directa de un punto del objeto (rayo rojo) como parte de la iluminación difusa de ese mismo punto (cono rojo claro). En la posición B, cuando la CCD se encuentra más alejada del objeto, no se registra la luz directa de ese mismo punto (rayo rojo no pasa por CCD), sin embargo sí se registra la luz difusa de ese punto. Cuando más cerca esté la cámara del objeto (Fig. 8a) se recoge más luz directa de una zona mayor del objeto. Al alejarse (Fig. 8b) se recoge sobre todo luz difundida.

La luz directa que registra la cámara corresponde a una zona del objeto que depende de la posición transversal de la cámara. En el holograma de la Fig. 10a se observan dos líneas oscuras a la izquierda y abajo de la imagen que corresponden a la proyección de las líneas del papel milimetrado. En la reconstrucción de la Fig. 10a aparecen la imagen real (arriba) y virtual (abajo) del objeto. En la imagen real se ve que abajo y a la izquierda de la zona más brillante aparecen las líneas del papel milimetrado. En la Fig. 10b la cámara se ha bajado. Se ve en el centro y a la izquierda las líneas negras tanto en el holograma como en su reconstrucción. En la Fig.10c la cámara se ha bajado todavía más. En este caso en el holograma no se ven las líneas negras, mientras que en la

reconstrucción si se ven arriba y a la izquierda con un menor brillo (debido a la luz difusa registrada en la CCD).

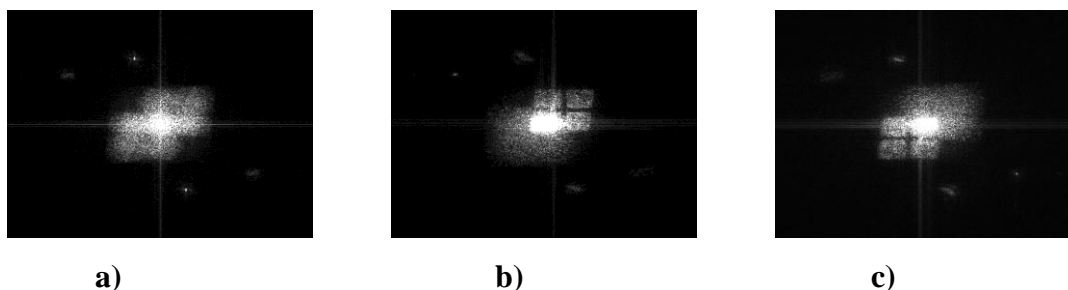


**Figura 10: Holograma (izquierda) y reconstrucción (TF a la derecha) para distintas posiciones transversales de la cámara.**

### 3.2. Configuración *en línea*

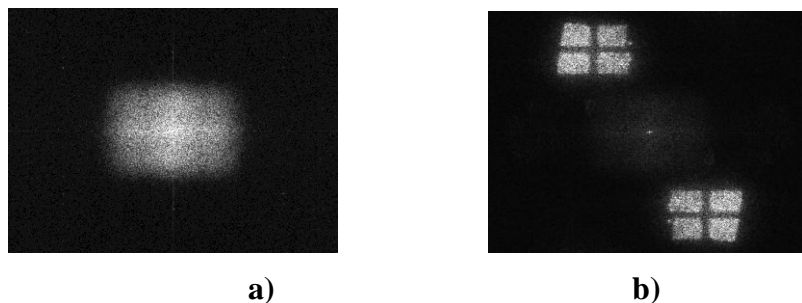
Esta configuración se obtiene a partir del montaje de la Fig. 6 tapando el haz de referencia. Ahora el haz de iluminación también actúa como haz de referencia.

El foco del haz de iluminación se encuentra a 140 mm con respecto a la cámara, mientras que el objeto está a 120 mm. El hecho de que la iluminación sea divergente permite considerar a este holograma como un holograma de Fourier sin lente. La imagen se reconstruye calculando su TF. Por lo tanto, se reconstruye el plano del origen del haz de referencia. Como en este caso este plano no coincide con el plano del objeto, las imágenes reconstruidas aparecen desenfocadas (Fig. 11a). Una reconstrucción por el método de Fresnel permite la propagación a cualquier plano, pudiéndose enfocar la imagen real (Fig. 11b) o la imagen virtual (Fig. 11c). Ambas imágenes se encuentran a una misma distancia a ambos lados del plano del origen del haz de referencia (20 mm).



**Figura 11: Reconstrucción de un holograma en línea con distancia entre objeto y CCD de 140 mm en a) el plano de Fourier; b) el plano real a 120 mm; c) el plano virtual a 160 mm.**

Esta configuración solo se puede usar con objetos translúcidos. Si el objeto a estudiar es demasiado difusor no pasará luz directa a través de él y por lo tanto no habrá holograma (sólo se registra el objeto). En la Fig. 12a se muestra un ejemplo de lo que se obtiene en estas circunstancias. Se ha utilizado el mismo objeto que en los experimentos anteriores al que se le ha añadido una lámina de papel cebolla. La Fig. 12b muestra lo que se obtiene registrando un holograma de ese mismo objeto con la configuración fuera de eje descrita en el punto 3.1. Se reconstruyen perfectamente las imágenes real y virtual con una intensidad uniforme, debido a que ahora toda la luz que viene del objeto es luz difundida.



**Figura 12: Reconstrucción del holograma de objeto difusor en a) configuración fuera de eje; b) configuración en línea.**

### 3.3. Configuración en línea (nueva versión)

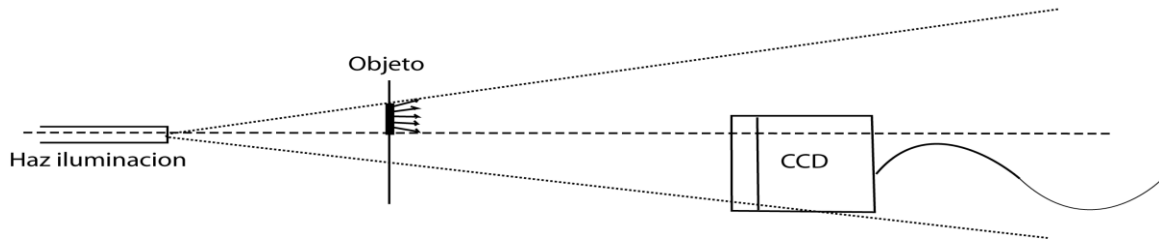
En la Fig. 11 se observaba que a pesar de ser una configuración en línea, las imágenes real y virtual no están completamente solapadas. Lo mismo se obtuvo en las Figs. 7e y 7d. En ellas el término de orden 0 (imágenes desenfocadas) equivale a lo obtenido en la Fig. 11.

En realidad, cuando se registran hologramas con el montaje mostrado en la Fig. 6, lo que estamos haciendo es registrar simultáneamente dos hologramas. Por un lado, el haz de referencia forma un holograma fuera de eje con la luz que proviene del objeto. Pero además, el hecho de iluminar el objeto desde atrás hace que estemos registrando también un holograma en línea. El término de orden 0 en las Fig. 7e y 7d es la reconstrucción de dicho holograma. Este holograma en línea proporciona, además,

imágenes parcialmente separadas. Este llamativo resultado es importante porque aumenta la relación señal/ruido de las imágenes reconstruidas. Es decir, se tendría la ventaja de una configuración fuera de eje (imágenes separadas y de buena calidad) con la simplicidad de la configuración en línea. Por ello se ha estudiado como aumentar la separación entre las imágenes proponiendo una configuración nueva (Fig. 13).

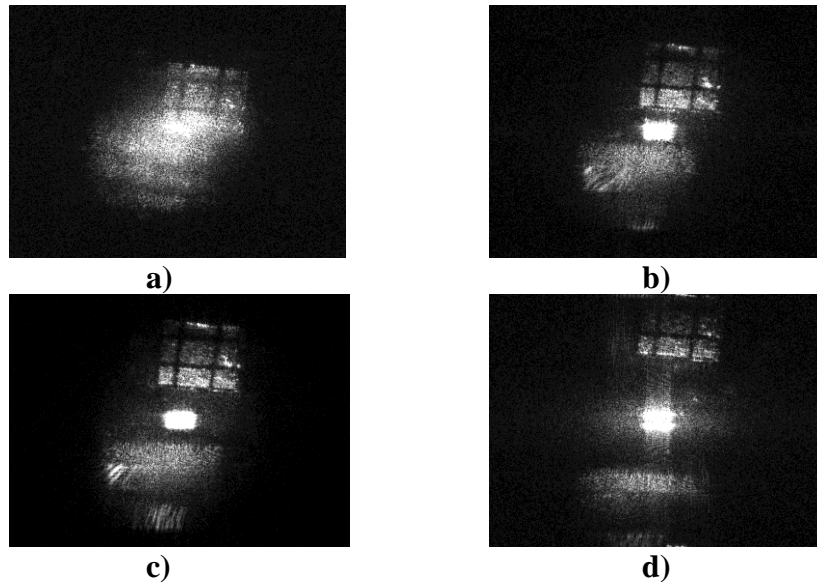
La idea consiste en hacer que parte del haz de iluminación atraviese el objeto haciendo de haz objeto y otra parte no pase por él haciendo de haz de referencia (Fig.13). El haz objeto es ahora la luz difundida por el objeto que llega a la cámara. El haz de referencia es la parte del haz iluminación que no atraviesa el objeto.

Hay dos formas de ajustar esta nueva configuración, moviendo el sensor CCD o el objeto. En microscopia habitualmente se mueve el objeto. Sin embargo, dado que en los experimentos que realizamos registramos tanto hologramas en línea como fuera de eje es más conveniente no mover el objeto para no desajustar el sistema.



**Figura 13: Esquema montaje de configuración en línea nueva.**

Para optimizar la separación de las imágenes se desplazó en altura la cámara en intervalos de 3 mm (Fig. 14). Se ve como las imágenes se separan más en altura hasta llegar a desaparecer por arriba y aparecer por abajo (Fig.14d).



**Figura 14: Reconstrucción de la imagen real desplazando la CCD de manera transversal en altura desde a) hasta d).**

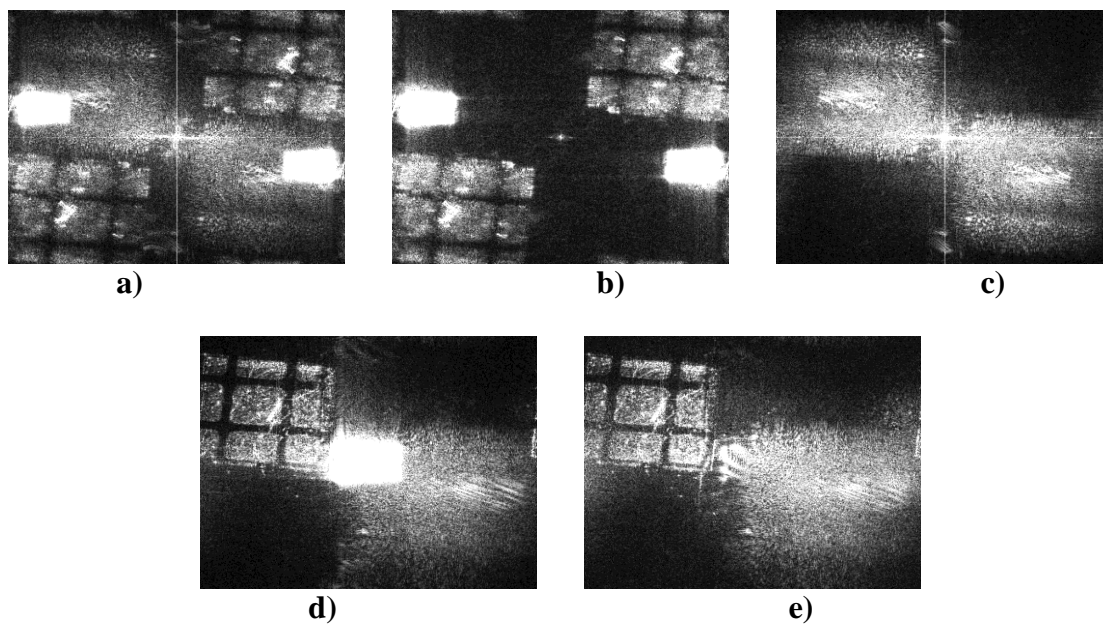


Para finalizar se han comparado las configuraciones fuera de eje y la nueva configuración en línea. El montaje utilizado es el de la Fig. 6. El objeto es translucido con un tamaño de  $3 \times 3 \text{ mm}^2$ . Éste se ha colocado de forma que en la configuración fuera de eje proporciona un holograma de Fourier sin lente del objeto. Luego se ha ajustado el haz de iluminación según como se indica en la Fig. 13.

En este experimento, llamamos holograma (H) al registrado en la configuración fuera de eje. Llamamos referencia (R) al haz de referencia de la configuración fuera de eje. El holograma para la configuración nueva es lo que llamamos haz objeto (O) en la configuración fuera de eje. El haz de referencia de la configuración nueva es lo que llamamos haz iluminación (RO) en la configuración fuera de eje. Se obtiene tapando el objeto.

La Fig. 15 muestra los resultados obtenidos para una configuración fuera de eje. En la Fig. 15a se ven las imágenes real y virtual completamente separadas, enfocadas y simétricas con respecto al centro del holograma. En la diagonal opuesta se ven las imágenes real y virtual igualmente separadas, simétricas con respecto al centro, pero desenfocadas debido a la configuración en línea nueva. Estas imágenes son análogas a las de la Fig. 7c. En la Fig. 15b se ven solo las imágenes debidas a la configuración fuera de eje porque hemos restado antes el objeto (O) al holograma (H).

La Fig. 15c muestra la TF de O. De manera análoga a lo que se mostraba en la Fig. 11 las dos imágenes aparecen desenfocadas. Para recuperar la imagen tenemos que propagar al plano de enfoque (Fig. 15d). En esta figura se observa además la imagen virtual desenfocada y el término de la referencia (RO) como en cualquier holograma fuera de eje. En esta nueva configuración en línea el término RO va a tener un tamaño no despreciable. Ello es debido a que el origen del haz RO no puede estar nunca en el plano del objeto. La única forma de eliminar este término es restándole al holograma O el haz RO, el cual se registra sin más que quitar el objeto.



**Figura 15: Reconstrucción de a) H en el plano de Fourier; b) H-R-O en el plano de Fourier; c) O en el plano de Fourier; d) O en el plano real; e)O-RO en el plano real.**

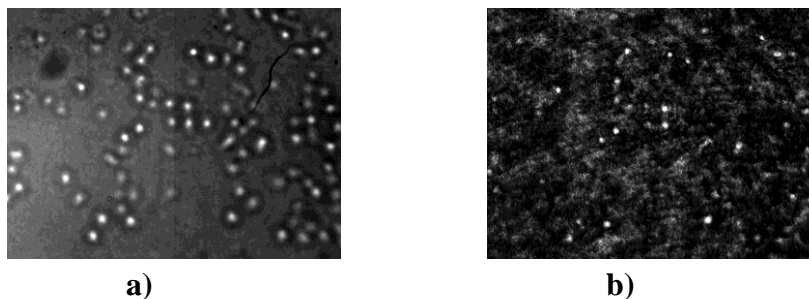
## CAPÍTULO 4

### RESULTADOS

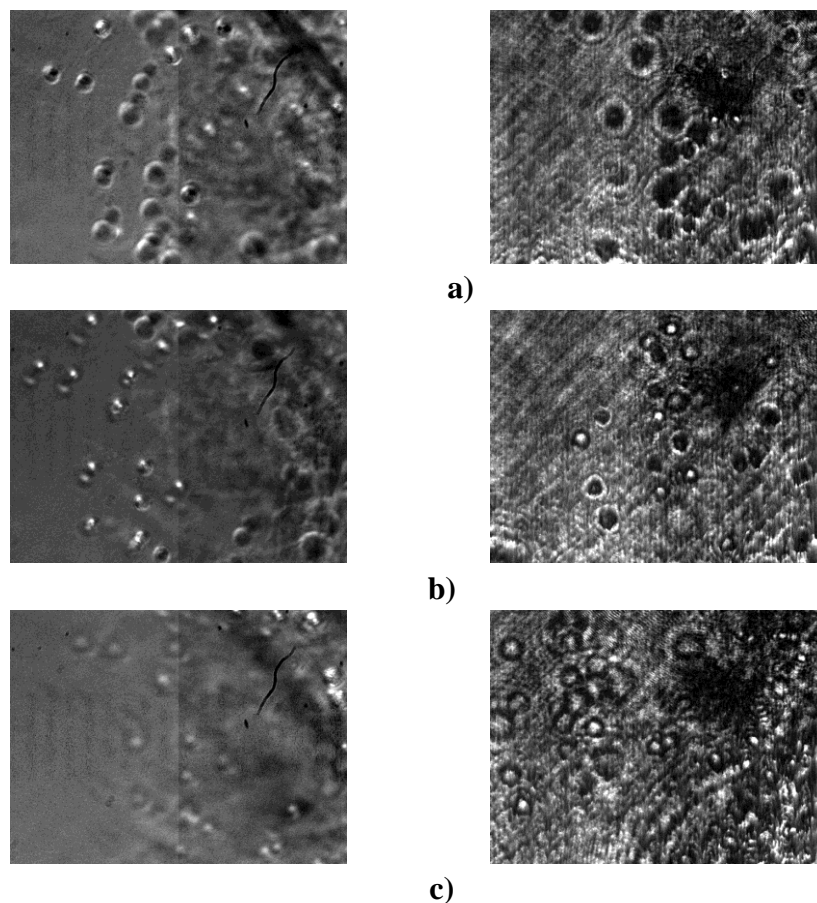
Tras poner a punto algunos de los montajes más habituales de holografía digital y analizar uno nuevo, vamos a medir algunas muestras biológicas con interés práctico.

Hasta la fecha la gran mayoría de los estudios en biología se han realizado en sistemas bidimensionales. Sin embargo, últimamente se ha observado que el comportamiento celular en un sistema tridimensional es completamente diferente al sistema 2D y que además se asemeja más al comportamiento natural de las células [5].

Existen varias formas de estudiar el comportamiento de las células en sistemas tridimensionales. En este trabajo se han estudiado células (con un tamaño de decenas de  $\mu\text{m}$ ) en diferentes tipos de estructuras. El cultivo de células se puede embeber directamente en una matriz de hidrogel de origen sintético o natural (dendrímeros o colágeno) de unas dimensiones de  $2 \times 2 \times 1 \text{ mm}^3$ . En dicha matriz se pueden fijar las células en la superficie (Fig. 16) o en todo el volumen (Fig. 17). Otro tipo de estructura en el que se puede fijar el cultivo es sobre un sustrato plano de PVC de  $3 \times 3 \times 0.5 \text{ mm}^3$ .

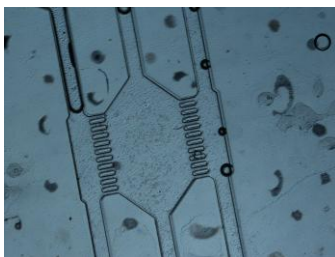


**Fig 16: Imágenes de cultivo de células en un gel de colágeno en 2D (G2D) obtenidas mediante iluminación a) blanca; b) láser.**



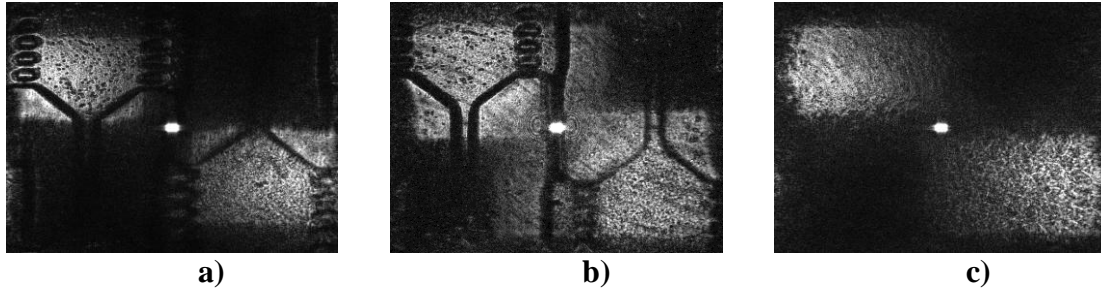
**Figura17: a), b), c) imágenes de células distribuidas por todo un gel de colágeno (G3D) tomadas mediante iluminación blanca (izquierda) e iluminación láser (derecha) para diferentes planos.**

En los dispositivos microfluidicos se confina el hidrogel con las células a estudiar de una manera mucho más controlada que en las matrices de hidrogel, lo que permite una posterior estimulación química o mecánica. La Fig. 18 presenta una imagen de un microcanal de dimensiones  $3 \times 1 \times 0.3 \text{ mm}^3$ , en donde las células se introducen en la cavidad central mientras que por las estructuras ovaladas se intercambian sustancias (nutrientes, oxígeno, etc.) con fluidos que circulan por los canales adyacentes al núcleo central.



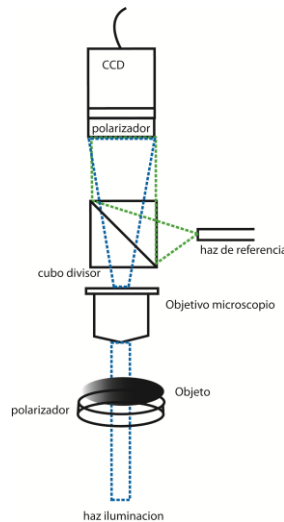
**Figura 18: Estructura de microcanal.**

En la Fig. 19 presentamos reconstrucciones de hologramas fuera de eje de células embebidas en un microcanal y en la superficie del gel de colágeno G3D. En ellas, las células se ven como puntos negros. En las Figs. 19a y 19b se pueden ver tanto la estructura del microcanal como las células enfocadas en la imagen de arriba. La Fig. 19c muestra la estructura de gel de colágeno. En esta figura se observa que la resolución del sistema no permite diferenciar entre las células y la propia estructura del gel.



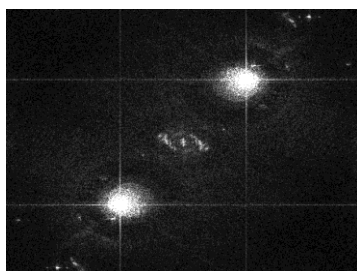
**Figura 19: TF de hologramas de a) y b) un microcanal con células; c) un cultivo de células en un hidrogel.**

Con la configuración que hemos adoptado ya hemos visto que las células utilizadas no pueden resolverse. Para obtener mayor resolución hemos utilizado un objetivo de microscopio 20x. De este modo registramos holográficamente la imagen del objeto aumentada (Fig. 20).



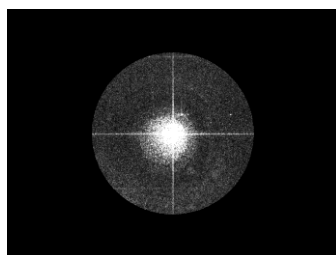
**Figura 20: Montaje con alta resolución para medida de células.**

Con la incorporación al montaje del objetivo de microscopio registramos hologramas del plano focal del objetivo que coincide con el plano del origen del haz de referencia. Al hacer la TF del holograma, el origen del haz de referencia está concentrado en el centro del holograma, mientras que el del haz de iluminación aparece concentrado en el centro de la imagen real y virtual (en la diagonal del holograma) como ilustra la Fig. 21. Esto hace que se pueda eliminar simultáneamente tanto la contribución directa del objeto como la de la referencia mejorando la relación señal/ruido.

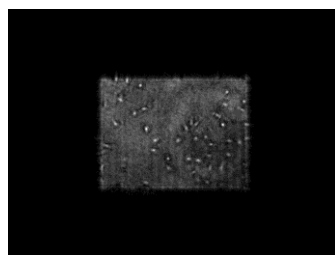


**Figura 21: Reconstrucción del holograma en a) el plano de origen haz de referencia/focal objetivo.**

Para obtener la imagen de las células primero centramos la imagen real del holograma y seleccionamos ésta mediante un filtro [6], eliminando la referencia y la imagen objeto virtual (Fig. 22a). Después propagamos desde este último plano al plano de enfoque obteniendo la imagen objeto con la suficiente resolución para ver las células (Fig. 22b).



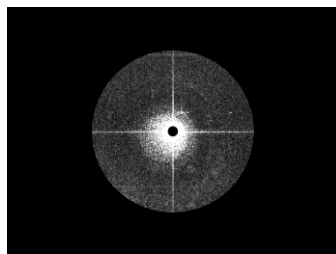
**a)**



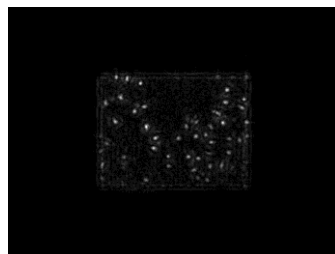
**b)**

**Figura 22: Reconstrucción holograma en a) plano apertura; b) imagen del objeto en el plano real.**

Además podemos aplicar en la reconstrucción del holograma técnicas de campo oscuro. Este tipo de técnica consiste en eliminar la contribución de la luz directa del haz de iluminación. Tal y como muestra la Fig. 23. a simplemente se bloquea la zona central de la imagen con un “punto”. Luego se propaga el holograma al plano de enfoque (Fig. 23b).



**a)**



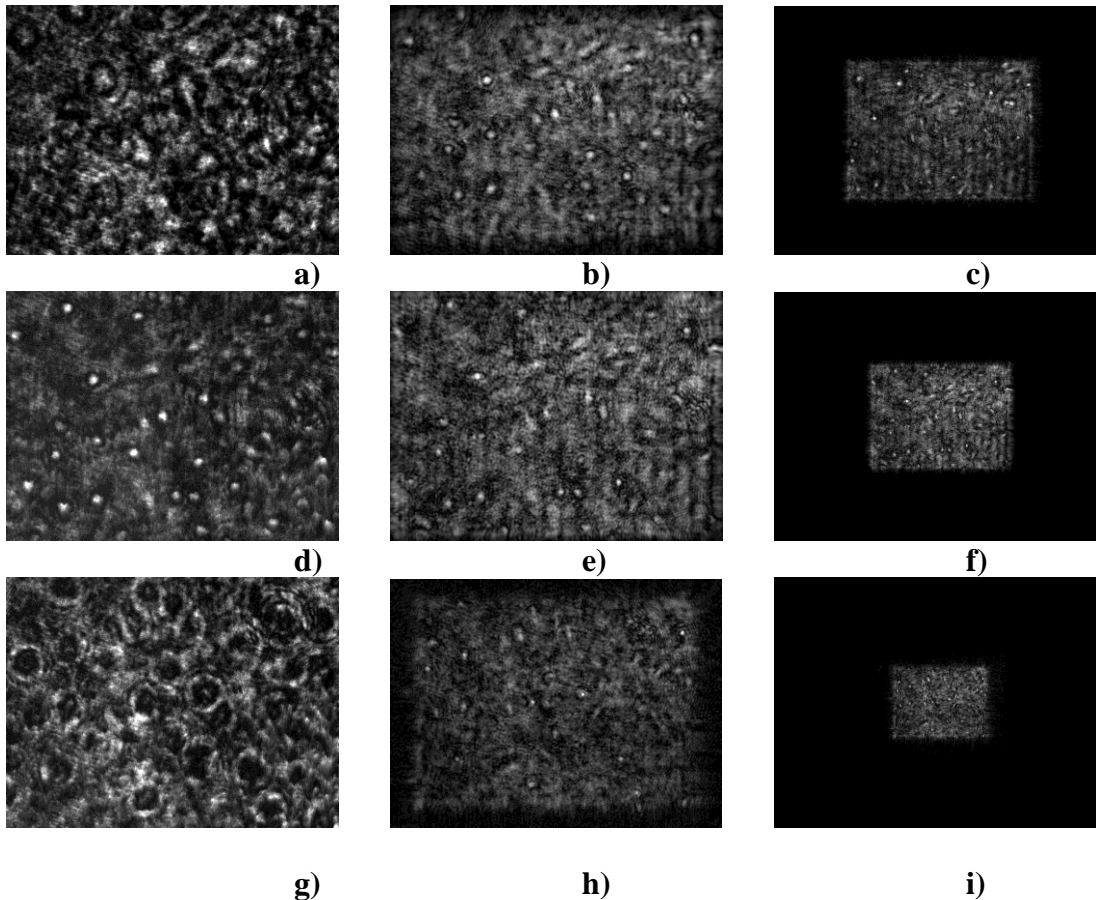
**b)**

**Figura 23: Reconstrucción holograma en a) plano apertura; b) imagen del objeto en el plano real.**

En un microscopio óptico los aumentos son constantes. El objeto se desplaza con respecto a éste hasta que se encuentre enfocado para tomar imágenes. Sin embargo, en un

microscopio holográfico se registra la imagen del patrón de interferencias, el cual contiene información de todo el volumen. Por ello se puede reconstruir cualquier plano independientemente de su posición con respecto al plano focal del sistema. El inconveniente es que el tamaño de la imagen reconstruida si depende de esta posición del objeto.

Así, se ha estudiado como varía el tamaño de la imagen en función de la posición del objeto con respecto al objetivo de microscopio. En las Fig. 24c, f, i se puede ver este fenómeno si registramos hologramas de un gel 2D (G2D) , en donde cuanto más cerca esté el objeto del objetivo la imagen ocupará una zona menor. Otro efecto que se ha visto es que una ligera variación de la posición (1 mm) del objeto (Fig.24a, d, g) conlleva una variación mayor (del orden de 100  $\mu$ m) del plano de la imagen. Por último en las Fig. 24 b, e, h se muestran las reconstrucciones de la imagen en el plano de enfoque seleccionando solo el objeto, en ellas se resuelven las células con un contraste mayor que en en la configuración anterior (Fig. 19).

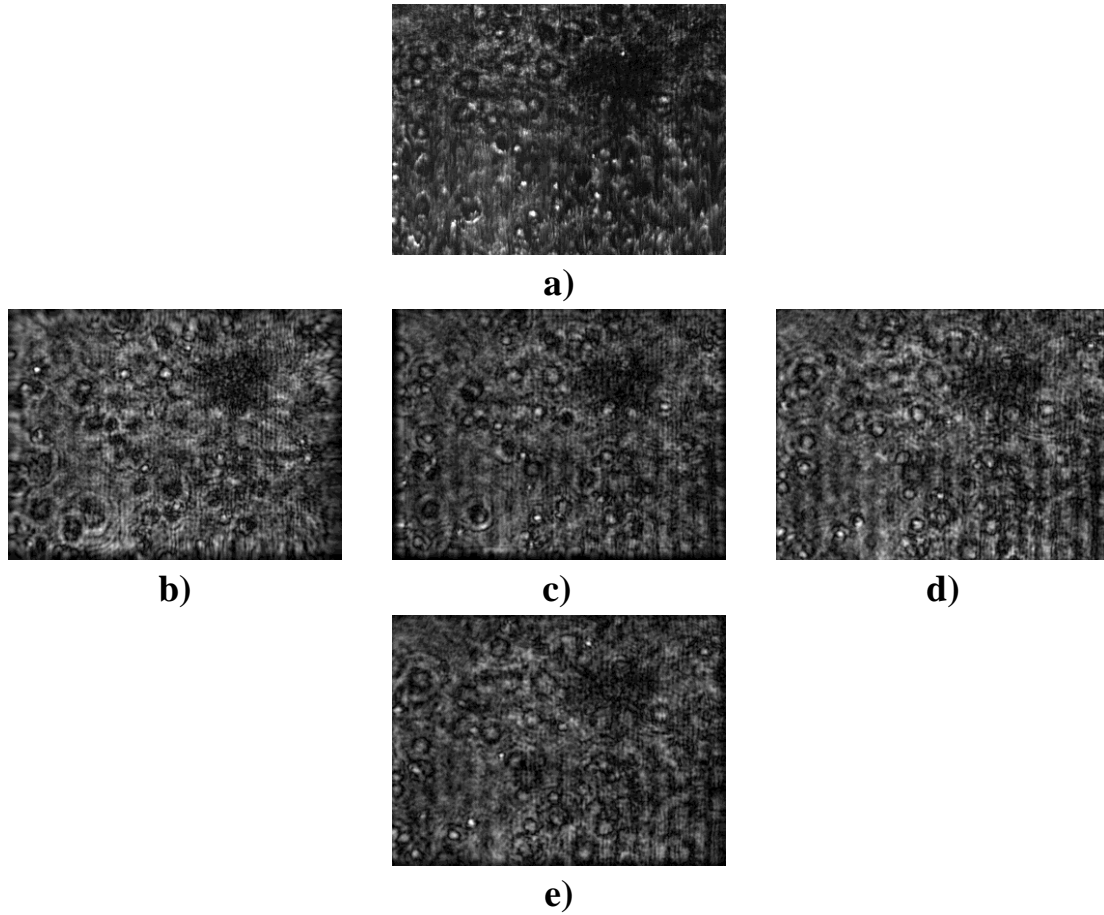


**Figura 24: Imágenes de cultivo de células en superficie (G2D) (izquierda); reconstrucciones de hologramas en plano de enfoque con objeto seleccionado y aumentado (centro); reconstrucciones de hologramas en plano de enfoque (derecha).**

Como último resultado obtenido, en el estudio de estructuras en 3D se puede reconstruir un objeto tridimensional en más de un plano a partir de un único holograma. Sin embargo, el tamaño del objeto en cada plano de propagación será diferente debido a

que se ha introducido en la configuración un objetivo de microscopio que actúa como una lente.

La Fig. 26a presenta la imagen de un plano de gel de un tamaño de  $2 \times 2 \times 1 \text{ mm}^3$  con células dentro de él. En las Fig. 26. b, c, d, e se muestran reconstrucciones de diferentes planos en donde se ven células enfocadas.



**Figura 25: a) Objeto; b), c), d) y e) Reconstrucción del holograma en diferentes planos.**



## **CAPITULO 5**

### **CONCLUSIONES**

En este trabajo se han estudiado tres tipos de configuraciones de holografía (configuración fuera de eje, en línea y de Fourier) utilizando como haces de iluminación y de referencia haces divergentes. Se han analizado sus reconstrucciones según la posición del sensor, la naturaleza difusora del objeto, su tamaño, etc. Se han comparado las tres configuraciones de manera simultánea dado que el montaje llevado a cabo permite registrar hologramas tanto en configuración en línea como en fuera de eje.

La configuración en línea se ha desarrollado hasta tener una configuración nueva que combina las ventajas de la configuración en línea y de fuera de eje. El montaje es tan fácil como en una configuración en línea y permite la separación completa de las imágenes real y virtual como en una configuración fuera de eje. Ello es debido al uso de un haz divergente como haz de referencia.

Se han registrado hologramas en una configuración fuera de eje de células de un tamaño de 10-20  $\mu\text{m}$  en diferentes medios de cultivo, colocadas en la superficie o en todo el volumen. Se ha comprobado que para resolverlas se necesita un objetivo de microscopio.

Se ha comprobado que al reconstruir hologramas mediante la técnica de campo oscuro mejora la relación señal/ruido de las imágenes.

Por último, hemos podido reconstruir varios planos de una imagen tridimensional a partir de un único registro de holograma.

Todo ello supone una ventana abierta para el estudio sobre el procesado holográfico de imágenes tridimensionales por diferentes métodos de registro y reconstrucción.

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] Jorge Garcia-Sucerquia, Wenbo Xu, Stephan K.Jericho, Peter Klages, Manfred H.Jericho, and H.Jurgen Kreuzer. **Digital in-line holography microscopy**. *Applied Optics*, (Vol. 45, No. 5, 2006).
- [2] Waleed S.Haddad, David Cullen, Johndale C. Solem, James W. Longworth, Armon McPherson, Keith Boyer and Charles K.Rhodes. **Fourier-transform holographic microscope**. *Applied Optics*, (Vol. 31, No. 24, 1992).
- [3] Etienne Cuhe, Pierre Marquet, and Christian Depeursinge. **Simultaneous amplitud-contrast and quantitative phase-contrast microscopy by numerical reconstruction of Fresnel off-axis holograms**. *Applied Optics*, (Vol. 38, No. 34, 1999).
- [4] Myung K.Kim.**Principles and techniques of digital holographic microscopy**. *SPIE Reviews* (Vol.1, 2010)
- [5] Björn Kemper, Gert von Bally. **Digital holographic microscopy for live cell applications and technical inspection**. *Applied Optics* (Vol. 47, No. 4, 2008).
- [6] J Lobera, N Andrés, MP Arroyo. **Digital speckle pattern interferometry as a holographic velocimetry technique**. *Measurement Science and Technology* (Vol. 15, No.4, 2004,718-724).